

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.004>

## 达卡巴嗪诱导黑素瘤耐药细胞系的建立及其耐药性

孙金中<sup>1</sup>, 孙圣荣<sup>1</sup>, 蒋冠<sup>2</sup>

(1. 武汉大学人民医院乳腺甲状腺外科, 武汉 430060; 2. 徐州医科大学附属医院皮肤性病科, 江苏 徐州 221000)

**[摘要]** 目的: 建立对达卡巴嗪(dacarbazine, DTIC)耐药的黑色素瘤细胞系并探讨其耐药性。方法: 通过Western印迹检测人黑色素瘤细胞株O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O<sup>6</sup>-methylguanaine-DNA methyltransferase, MGMT)蛋白表达; 通过体外分步诱导法使人黑色素瘤A375细胞对DTIC产生耐药性; 利用MTT法检测耐药细胞株半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)和耐药指数。结果: 经不同浓度的DTIC处理后, A375细胞生长均不同程度地减慢, 随着DTIC浓度的升高, 细胞抑制率呈不同程度地增加。DTIC对亲本A375细胞与A375/DTIC细胞体外增殖的IC<sub>50</sub>分别为10.766和95.693。与亲本A375细胞相比, A375/DTIC细胞对DTIC的耐药指数是A375细胞的9倍, 两组之间的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 采用分阶段适度递增化疗药物浓度可以在体外成功地建立由DTIC诱导的人黑色素瘤耐药细胞系A375/DTIC。

**[关键词]** 黑色素瘤; 达卡巴嗪; O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶

## Establishment of a dacarbazine-induced resistance melanoma cell line and its drug resistance

SUN Jinzhong<sup>1</sup>, SUN Shengrong<sup>1</sup>, JIANG Guan<sup>2</sup>

(1. Department of Breast and Thyroid Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060;  
2. Department of Dermatology, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou Jiangsu 221000, China)

**Abstract** **Objective:** To establish a melanoma cell line resistant to dacarbazine (DTIC) and to investigate its drug resistance. **Methods:** O<sup>6</sup>-methylguanaine-DNA methyltransferase (MGMT) protein expression of a human melanoma cell line was detected using Western blot. The drug resistance of human melanoma A375 cells to DTIC was induced by in vitro stepwise induction. Drug-resistant cell line IC<sub>50</sub> and resistance index were detected by MTT assay. **Results:** After treated with DTIC at different concentrations, the growth of A375 cells slowed down in different degrees. With the increase of DTIC concentration, the inhibition rate of A375 cells increased in different degrees. The median inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of DTIC to in vitro proliferation of parent A375 cells and A375/DTIC cells was 10.766 and 95.693, respectively. The resistance index of A375/DTIC cells to DTIC was 9 times higher than that of A375 cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The successful establishment of a DTIC-

收稿日期 (Date of reception): 2017-09-01

通信作者 (Corresponding author): 蒋冠, Email: dr.guanjiang@gmail.com

基金项目 (Foundation item): 湖北省自然科学基金 (2017CFB628)。This work was supported by Hubei Provincial Natural Science Foundation, China (2017CFB628).

induced drug-resistant human melanoma cell line A375/DTIC in vitro by gradually increasing the concentration of chemotherapeutic drugs with stages lays an experimental foundation for further study on the mechanism of melanoma resistant to DTIC.

**Keywords** melanoma; dacarbazine; O<sup>6</sup>-methylguanane-DNA methyltransferase

近年来针对恶性黑色素瘤的化疗药物已有大量研究, 但均未取得较大进展。临床化疗药物中最有效的药物是达卡巴嗪(dacarbazine, DTIC)。DTIC是唯一被美国FDA推荐用来治疗恶性黑色素瘤转移阶段的药物, 但其有效率约为20%<sup>[1]</sup>。其余依次为卡莫司汀(BCNU)显效率18%、甲环亚硝脲(Me-CCNU)显效率16%、顺铂(DDP)显效率15%。DTIC联用两种及三种药物疗效提高到24%及31%, 但毒性反应显著增加<sup>[2]</sup>。四药联合方案如Dartmouth方案(DDP+BCNU+DTIC+TAM)并不比单药DTIC更有效, 而且增加毒性。如何提高黑色素瘤细胞的化疗敏感性及靶向性是当前研究的热点与难点, 也是提高黑色素瘤整体疗效的关键<sup>[3]</sup>。

DTIC的细胞毒性主要是对DNA链的甲基化, 引起DNA单链或双链断裂, 阻断DNA复制, 导致肿瘤细胞死亡。鸟嘌呤O<sup>6</sup>甲基化是导致细胞损伤的最强烈原因。鸟嘌呤O<sup>6</sup>甲基化所形成的O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤(O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>6</sup>MeG)在DNA复制的下一循环中错配成胸腺嘧啶, 触发无效DNA错配修复, 导致肿瘤细胞死亡<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明化疗药物所诱导的DNA损伤修复通路在耐药性产生中扮演重要角色。O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶(O<sup>6</sup>-methylguanane-DNA methyltransferase, MGMT)是一种重要的DNA损伤修复蛋白, 与肿瘤细胞对烷化剂耐药密切相关<sup>[6]</sup>。

因此了解黑色素瘤对DTIC的耐药机制, 对于探讨逆转黑色素瘤耐药的有效方式, 提高其对黑色素瘤的化疗效果, 延长患者的生存期具有重要意义。本研究围绕在体外培养细胞培养液中逐渐增加DTIC药物浓度, 探讨建立针对DTIC耐药的人黑色素瘤细胞耐药系, 目前尚无相关报道, 希望为进一步研究黑色素瘤耐药机制及寻找有效的逆转方式提供良好的实验材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DTIC为南京制药厂产品。DMSO购自美国Sigma公司。人黑色素瘤A375细胞株、MV3细胞株、M14细胞株购于江苏凯基生物技术股份有限公司。

MTT试剂盒购于南京凯基公司。MGMT兔抗人一抗为英国Abcam公司产品。羊抗兔二抗为北京中杉金桥公司产品。

### 1.2 黑色素瘤细胞复苏、传代、冻存

将细胞冻存悬液转移到离心管内, 加入约5 mL培养液, 轻轻吹打混匀, 离心5 min。向细胞沉淀内加入完全培养液, 混匀, 将细胞悬液进行培养。培养瓶中的细胞覆盖率达到80%~90%时, 把原有培养基吸掉; 加适当的胰蛋白酶(0.25%); 用移液枪吹打细胞, 然后将细胞吸到15 mL的离心管中, 1 000 r/min离心5 min; 向细胞沉淀物中加入冷冻保护液, 轻轻吹打混匀, 使细胞密度达 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL, 冻存。

### 1.3 Western 印迹检测 MGMT 蛋白表达

检测处于对数生长期的A375细胞、MV3细胞、M14细胞(各 $6 \times 10^6$ 个)的MGMT表达水平。100  $\mu$ L十二烷基磺酸钠上样缓冲液煮沸提取MGMT, 4  $^{\circ}$ C、离心半径5.5 cm, 以12 000 r/min高速离心15 min, 取20  $\mu$ L上样量。48 h后快速制备法提取总蛋白, 经电泳、转膜后杂交, 一抗为兔抗人单抗, 二抗为碱性磷酸酶偶联羊抗兔多抗, 以NBT/BCIP显色, 结果拍照。

### 1.4 诱导建立人黑色素瘤细胞株 A375/DTIC

以初始诱导剂量(1.953125  $\mu$ g/mL)的DTIC冲击处于对数生长期的A375细胞悬液( $1 \times 10^5$ 个/mL), 培养24 h后弃去含药培养基, 胰酶消化, 以 $1 \times 10^5$ 个/mL细胞浓度接种于新培养瓶中, 次日换液, 待其逐渐长至70%~80%满瓶时再次冲击, 开始倍增药物诱导剂量, 每个剂量保持培养10~15 d。至第8个月末可诱导出对DTIC具有9倍耐药指数的细胞系, 并达到最高诱导剂量为2 000  $\mu$ g/mL, 命名为A375/DTIC。

### 1.5 MTT 法检测细胞耐药性

细胞消化、计数、配制成浓度为 $3 \times 10^4$ 个/mL的细胞悬液, 96孔细胞培养板中每孔加入100  $\mu$ L细胞悬液(每孔 $4 \times 10^3$ 个细胞); 96孔细胞培养

板置于37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h; 用完全培养基稀释药物至所需浓度, 每孔加入100 μL相应的含药培养基, 同时设立阴性对照组, 阳性对照组; 96孔细胞培养板置于37℃, 5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养72 h; 将96孔板进行MTT染色, 测定波长490 nm处的OD值; 每孔加入20 μL MTT(5 mg/mL), 在培养箱继续培养4 h; 弃去培养基, 每孔加入150 μL DMSO溶解, 摇床10 min轻轻地混匀; 酶标仪读出波长490 nm处每孔的OD值, 计算抑制率。

$$\text{实验组抑制率}(\%) = \frac{\text{阴性对照组OD值} - \text{实验组OD值}}{\text{阴性对照组OD值}} \times 100\%$$

### 1.6 统计学处理

应用SPSS 17.0通过概率单位加权回归法(Bliss法)计算IC<sub>50</sub>。耐药指数(RI)=耐药细胞株IC<sub>50</sub>/亲本细胞株IC<sub>50</sub>。均数之间差异性的比较采用单因素分析, P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞 MGMT 表达量分析结果

在人黑色素瘤A375, MV3, M14细胞株中, RT-PCR检测后的结果示A375细胞中MGMT的相对表达量最高, MV3和M14细胞中MGMT的相对表达量较低, 3组之间表达差异有统计学意义(P<0.05, 图1); Western印迹检测结果显示: A375细胞组较其它2组细胞, 能更显著地表达有活性的MGMT蛋白, 3组之间表达差异有统计学意义(P<0.05, 图2)。鉴于此, 本研究选择MGMT的相对表达量较高的细胞株A375作为后面实验的研究对象。

### 2.2 DTIC 对人黑色素瘤细胞株 A375 体外增殖的抑制作用

经1.953125, 3.90625, 7.8125, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1 000及2 000 μg/mL的DTIC处理后, A375细胞生长均不同程度地减慢, 随DTIC浓度的升高, 细胞抑制率呈不同程度地增加; 在2 000 μg/mL的DTIC作用后, A375细胞与A375/DTIC细胞的抑制率分别为90.61%和84.8%(图3, 表1)。DTIC对A375细胞 与A375/DTIC细胞体外增殖的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为10.766和95.693。A375/DTIC细胞对DTIC的耐药指数是A375细胞的9倍, 两组之间的差异有统计学意义(P<0.05; 表2)。

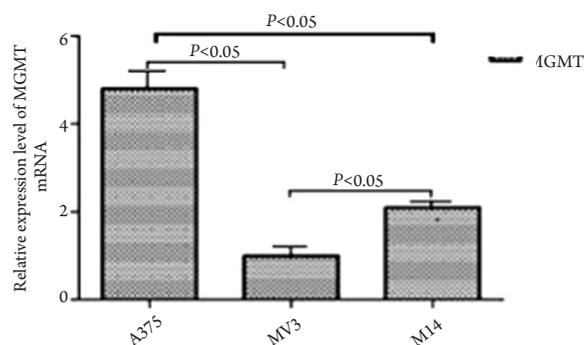


图1 RT-PCR检测A375, MV3, M14细胞株MGMT的相对表达量

Figure 1 Relative expression of MGMT (A375, MV3, M14) detected by RT-PCR

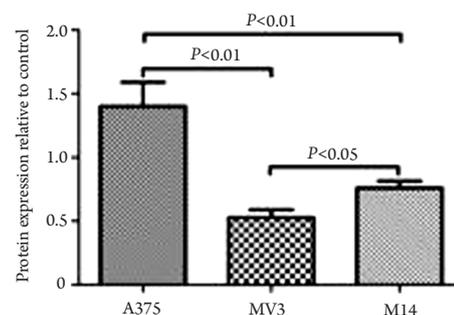
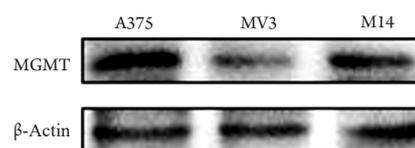


图2 Western印迹检测A375, MV3, M14细胞株MGMT的相对表达量

Figure 2 Relative expression of MGMT (A375, MV3, M14) detected by Western blot

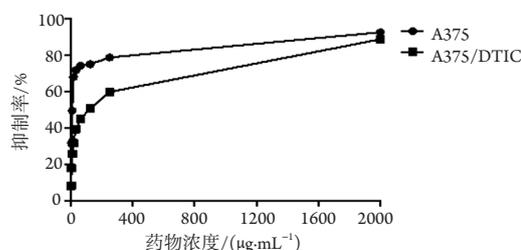


图3 达卡巴嗪对人黑色素瘤细胞株A375体外增殖的抑制作用  
Figure 3 Inhibitory effect of DTIC on the proliferation of human melanoma cell line A375 in vitro

表1 达卡巴嗪对人黑素瘤细胞株A375体外增殖的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of DTIC on the proliferation of human melanoma cell line A375 in vitro

剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	A375/%	A375/DTIC/%
2 000	90.61	84.80
1 000	85.53	74.37
500	81.16	64.41
250	78.79	59.90
125	75.16	50.91
62.5	74.30	44.93
31.25	71.90	39.34
15.625	68.01	31.86
7.8125	49.63	25.86
3.90625	31.69	18.09
1.953125	18.21	8.37

表2 达卡巴嗪对人黑素瘤细胞株 A375体外增殖的半数抑制浓度

Table 2 IC50 of DTIC on the proliferation of human melanoma cell line A375 in vitro

细胞株	IC50/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	耐药指数
A375	10.766	9
A375/DTIC	95.693	

### 3 讨论

黑素瘤的治疗手段主要包括手术治疗、放疗、化疗和靶向治疗。近年来恶性黑色素瘤化疗研究并未取得明显进展, 主要受限于化疗药物耐药和毒副作用等因素<sup>[7]</sup>。因此如何提高治疗的有效率并克服耐药的产生是未来努力的方向。

DTIC类烷化剂是黑素瘤化疗常用的一类药物, 可引起肿瘤细胞株DNA O<sup>6</sup>位烷基加合物形成, 导致细胞株分裂、增殖停止或死亡。MGMT在正常人的组织中广泛表达, 但在所有类型的人类肿瘤中过度表达, 包括结肠癌、神经胶质瘤、肺癌、乳腺癌、白血病、淋巴瘤、黑素瘤和骨髓瘤等<sup>[8]</sup>。MGMT可使DNA烷基化损伤得到修复, 是黑素瘤细胞对DTIC产生耐药的主要原因, 制约着烷化剂发挥更好的疗效<sup>[9]</sup>。因此了解黑素瘤对DTIC的耐药机制, 对于探讨逆转黑素瘤耐药

的有效方式, 提高其对黑素瘤的化疗效果, 延长患者的生存期具有重要意义, 而建立DTIC诱导黑素瘤耐药细胞株将为进一步研究提供良好的实验材料。

鉴于此, 本研究对人黑素瘤细胞株A375采用分步诱导法使其产生相对稳定的耐药性, 旨在通过了解体外该细胞株对DTIC耐药的机制, 从而解决继发性耐受性问题。本实验历时8个月, 采用分步诱导法即首先以初始诱导剂量培养人黑素瘤A375细胞株, 然后采用在培养基中倍增药物诱导剂量的方法, 应用DTIC诱导培养人黑素瘤细胞株A375, 成功地诱导出人黑素瘤耐药细胞系A375/DTIC, 与亲本A375细胞株相比, A375/DTIC细胞对DTIC的耐药指数是A375细胞的9倍, 两组之间的差异有统计学意义。

在人黑素瘤A375, MV3和M14细胞株中, RT-PCR和Western印迹检测结果显示: 与其它2组细胞相比, A375细胞组中有活性的MGMT表达更显著。经不同浓度的DTIC处理48 h后, A375细胞生长均不同程度地减慢, 随DTIC浓度的升高, 细胞抑制率呈不同程度地增加。DTIC对亲本A375细胞与A375/DTIC细胞体外增殖的IC50分别为10.766和95.693。

本研究采用了分阶段适度递增化疗药物浓度的作用方式, 在体外成功地建立1株由DTIC诱导的人黑素瘤耐药细胞系A375/DTIC, 探讨诱导耐药过程中倍增DTIC诱导剂量出现的耐药细胞株增殖抑制继而再增殖现象。这株细胞系的成功建立, 为进一步研究黑素瘤对DTIC的耐药机制及以后利用化疗药物增敏剂逆转黑素瘤的耐药奠定了实验基础。

### 参考文献

- Jiang G, Li RH, Sun C, et al. Dacarbazine-based combination therapies versus dacarbazine alone in patients with malignant melanoma: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e111920.
- Eberle J, Kurbanov BM, Hossini AM, et al. Overcoming apoptosis deficiency of melanoma-hope for new therapeutic approaches[J]. Drug Resist Updat, 2007, 10(6): 218-234.
- Tang JQ, Hou XY, Yang CS, et al. Recent developments in nanomedicine for melanoma treatment[J]. Int J Cancer, 2017, 141(4): 646-653.
- Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: Mechanisms of

- action, repair and resistance[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2012, 5(1): 102-114.
5. Johannessen TC, Bjerkvig R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2012, 12(5): 635-642.
  6. Kitange GJ, Carlson BL, Schroeder MA, et al. Induction of MGMT expression is associated with temozolomide resistance in glioblastoma xenografts[J]. *Neuro Oncol*, 2009, 11(3): 281-291.
  7. Jiang G, Li RH, Sun C, et al. Efficacy and safety between temozolomide alone and temozolomide-based double therapy for malignant melanoma: a meta-analysis[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(1): 315-322.
  8. Jiang G, Jiang AJ, Xin Y, et al. Progression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase and temozolomide resistance in cancer research[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(10): 6659-6665.
  9. Konduri SD, Ticku J, Bobustuc GC, et al. Blockade of MGMT expression by O6 benzyl guanine leads to inhibition of pancreatic cancer growth and induction of apoptosis[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(19): 6087-6095.

**本文引用:** 孙金中, 孙圣荣, 蒋冠. 达卡巴嗪诱导黑色素瘤耐药细胞系的建立及其耐药性[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(11): 2305-2309. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.004

**Cite this article as:** SUN Jinzhong, SUN Shengrong, JIANG Guan. Establishment of a dacarbazine-induced resistance melanoma cell line and its drug resistance[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(11): 2305-2309. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.11.004